

УДК 547.92.057

©Коллектив авторов

РЕГУЛЯЦИЯ БИОСИНТЕЗА И МЕТАБОЛИЗМА ХОЛЕСТЕРИНА В КЛЕТКАХ Нер G2 $\Delta 8(14)$ -15-КЕТОПРОИЗВОДНЫМИ ЭРГОСТАНА

А.Р. Мехтиев¹, В.И. Федченко¹, Я.В. Ткачев², В.П. Тимофеев², А.Ю. Мишарин^{1}*

¹Учреждение Российской академии медицинских наук, Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича РАМН, 119121, Москва, Погодинская ул., 10; тел.: (499) 246 5820; эл. почта: alexander.misharin@ibmc.msk.ru

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва

Проведено сравнительное изучение влияния 5α -холест-8(14)-ен-15-он-3 β -ола (**I**), (22E)- 5α -эргоста-8(14),22-диен-15-он-3 β -ола (**II**), (22S,23S)-22,23-оксидо- 5α -эргост-8(14)-ен-15-он-3 β -ола (**III**) и (22R,23R)-22,23-оксидо- 5α -эргост-8(14)-ен-15-он-3 β -ола (**IV**) на уровень экспрессии HMG-CoA редуктазы, CYP27A1 и CYP3A4 в клетках Нер G2. В отличие от 15-кетопроизводного холестана (**I**), производные 15-кетозергостана (**II–IV**) снижали уровень мРНК HMG-CoA редуктазы; (22R,23R)-22,23-оксидо- 5α -эргост-8(14)-ен-15-он-3 β -ол (**IV**) значительно повышал уровень мРНК CYP3A4 (320% от контроля). Кетостерин (**II**) эффективнее, чем кетостерин (**I**) подавлял биосинтез холестерина в клетках Нер G2 при продолжительной инкубации. С помощью компьютерного моделирования исследована конформация боковой цепи соединений (**I**) – (**IV**); показана взаимосвязь регуляторной активности этих соединений с конформационной подвижностью боковой цепи. Результаты указывают на возможность использования $\Delta 8(14)$ -15-кетопроизводных эргостана в качестве регуляторов биосинтеза и метаболизма стероидов в клетках печени.

Ключевые слова: оксистерин; холестерин; биосинтез; регуляция; клетки Нер G2; конформация боковой цепи.

ВВЕДЕНИЕ. Среди регуляторов метаболизма холестерина, представляющих интерес в качестве потенциальных фармакологических агентов, важное место занимают 15-оксигенированные стероиды [1]. 3 β -Гидрокси- 5α -холест-8(14)-ен-15-он (15-кетостерин, **I**, рис. 1) эффективно регулирует метаболизм холестерина в культуре клеток и снижает уровень холестерина и липопротеинов низкой плотности в плазме крови грызунов и приматов [1-8]. Тем не менее, использование 15-кетостерина (**I**) в качестве гипохолестеринемического препарата, оказалось малоэффективным вследствие его быстрой метаболической деградации в клетках печени [9-11]. Быстрое окислительное расщепление боковой цепи 15-кетопроизводных холестана в гепатоцитах и клетках Нер G2, приводит к полярным продуктам, слабо подавляющим биосинтез холестерина и легко выходящим из клеток [11].

Используемые сокращения: PMSF - фенолметилсульфонилфторид; HMG-CoA - гидроксиметилглутарил кофермент А; PBS - фосфатсодержащий физиологический раствор; FCS - эмбриональная сыворотка теленка; ЛПДС - липопротеин-дефицитная сыворотка (плазмы крови человека).

* - адресат для переписки

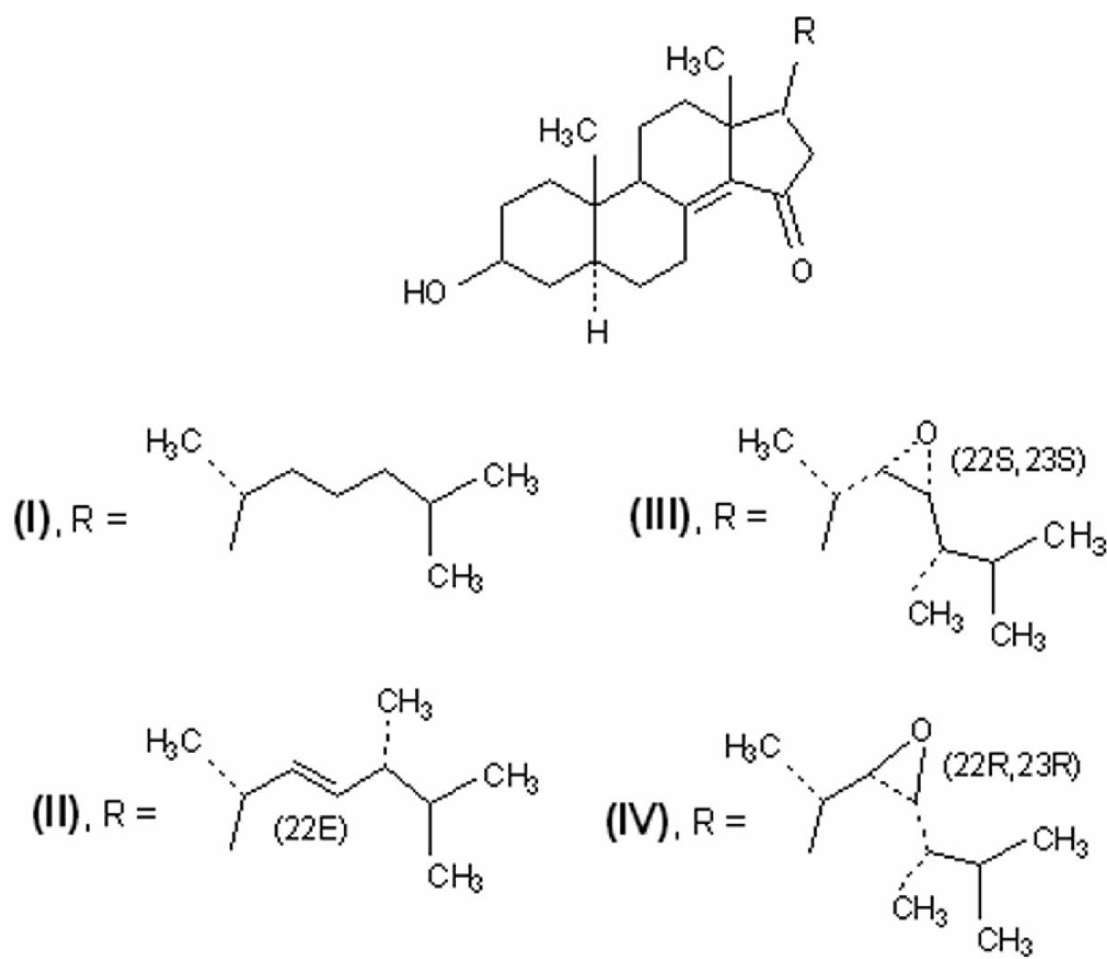


Рисунок 1.

5α-холест-8(14)-ен-15-он-3β-ол (I);
 (22E)-5α-эргоста-8(14),22-диен-15-он-3β-ол (II);
 (22S,23S)-22,23-оксидо-5α-эргост-8(14)-ен-15-он-3β-ол (III);
 (22R,23R)-22,23-оксидо-5α-эргост-8(14)-ен-15-он-3β-ол (IV).

С целью создания новых аналогов 15-кетостерина, обладающих большей устойчивостью к метаболической деградации в клетках печени, нами ранее был осуществлен синтез серии Δ8(14)-15-кетопроизводных эргостана [12-15]. Среди новых Δ8(14)-15-кетопроизводных эргостана найдены соединения, ингибирующие биосинтез холестерина в клетках Нер G2 при краткосрочной инкубации эффективнее, чем 15-кетостерин [14, 16, 17], снижающие уровень биосинтеза холестерина в присутствии сывороточных липидов [17], регулирующие активность ацил-КоА-холестерин-ацилтрансферазы [18] и стимулирующие окисление холестерина в клетках Нер G2 [17]. Гидроксилирование боковой цепи 3β-гидрокси-5α-эргоста-8(14),22-диен-15-она (II) в реакции, катализируемой стерин-27-гидроксилазой CYP27A1 проходило в 16 раз медленнее, чем гидроксилирование 15-кетостерина (I), причём главным метаболитом кетостерина (II) оказался продукт гидроксилирования по C28 [19].

Целью данной работы является сравнительное изучение четырёх Δ8(14)-15-кетостеринов (I-IV) в качестве регуляторов биосинтеза и метаболизма холестерина в клетках Нер G2. В работе исследовано влияние соединений (I-IV) на уровень экспрессии важнейших генов, участвующих в биосинтезе и метаболизме стерина и ксенобиотиков (HMG-КоА редуктазы, CYP27A1 и CYP3A4); изучено

влияние соединений (I) и (II) на скорость биосинтеза холестерина в клетках Hep G2 в различных условиях; показана взаимосвязь проявляемых эффектов с особенностями конформации боковой цепи производных эргостана.

МЕТОДИКА. Синтез соединений (II–IV) был описан ранее [12–15]; 5 α -холест-8(14)-ен-15-он-3 β -ол (15-кетостерин, I) синтезирован по методу [20] с незначительными модификациями; ЛПДС получена из плазмы крови здорового донора [21]. Холестерин, холестерилолеат, триолеин, PMSF, EDTA, трис-(гидроксиметиламино)-метан (трис), этидий бромид, PBS, додецилсульфат Na, детергенты тритон X-100 и NP 40, дезоксинуклеотид-5'-трифосфаты и РНК-аза А получены от фирмы “Sigma”; олигонуклеотиды, используемые в качестве праймеров ПЦР, от АОО “Синтол”; AMV-обратная транскриптаза, Taq-ДНК-полимераза от фирмы “Promega”; материалы для хроматографии от фирмы “Merck”; [1-¹⁴C]AcONa от фирмы “Amersham”; культуральный пластик от “Greiner”, “Costar” и “Corning”, культуральные среды и FCS от “Gibco BRL” и “HyClone”.

Клетки гепатомы человека линии Hep G2, полученные из Европейской Коллекции Клеточных Культур (ECACC), выращивали в 24-луночных, 6-луночных планшетах, чашках диаметром 35 мм или флаконах площадью 25 см². Клетки культивировали в средах RPMI 1640 и DMEM, содержащих 10% FCS, 0,08 мг/мл гентамицина, в атмосфере 5% CO₂ при 37°C. Перед экспериментом клетки выдерживали 24 ч в бессывороточной среде, или в среде, содержащей 10% ЛПДС. Исследуемые соединения добавляли к культуральной среде в этанольном растворе, содержание этанола во всех опытах, включая соответствующие контроли, составляло 1%.

Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре “Thermospectronic Helios”. Измерение радиоактивности липидных экстрактов проводили в толуольном сцинтилляторе; измерение радиоактивности водных растворов и клеточных экстрактов - в сцинтилляторах ЖС-8 и “Unisolv” на счетчике Tri-Carb 2800 TR (“Perkin Elmer”). Концентрацию белка определяли реакцией с бицихониновой кислотой [22], концентрацию холестерина - ферментативным методом при помощи стандартного набора “Оксохром Холестерин” фирмы “Lachema” по протоколу фирмы-изготовителя.

Влияние соединений (I–IV) на уровень мРНК HMG-CoA-редуктазы, CYP27A1 и CYP3A4 в клетках Hep G2. Клетки Hep G2 инкубировали с исследуемыми соединениями в концентрации 5 мкМ в бессывороточной среде в течение 24 ч. Выделение тотальной РНК проводили гуанидинизотиоционатным методом [23] по протоколу фирмы “Promega”, используя стандартные растворы и буферы, рекомендованные фирмой-изготовителем. Клетки, промытые стерильным PBS, лизировали, лизат центрифугировали 10 мин при 12000–14000 g и 20–25°C. Для выделения РНК супернатант разбавляли этанолом до концентрации последнего 30% и адсорбировали РНК на мембранном фильтре. После удаления остатков ДНК, РНК элюировали 100 мкл воды, не содержащей нуклеаз. Получение кДНК при помощи AMV-обратной транскриптазы проводили по протоколу фирмы “Promega”, используя в качестве матрицы выделенную РНК и в качестве праймеров – неупорядоченные гексануклеотиды. Для ПЦР использовали синтетические праймеры (5'-ATAGGAGGCTACAACGCCCATG и 3'-ATGTTAGTCTTTAGAACCCCAATGC) – для HMG-CoA редуктазы; (5'-TGCGCCAGGCTCTGAACCAG, 3'-TCCACTTGGGGAGGAAGGTG) - для CYP27A1; (5'-TTCAGCAAGAAGAACAAGGACAAC, 3'-GGTTGAAGAAGTCCTCCTAAGC) - для Cyp3A4 и (5'-GGCATCGTGATGGACTCCG, 3'-GCTGGAAGGTGGACAGCGA) – для актина (внутренний стандарт). Амплификацию (40 циклов) проводили в следующих условиях: денатурация – 20 сек при 90°C; отжиг – 15 сек при 55°C; элонгация – 10 сек при 72°C. Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 2% агарозном геле; зоны, окрашенные бромфеноловым синим, анализировали на приборе WAT-137LN и с помощью программы “ImageJ 1.36”.

Влияние соединений (I) и (II) на биосинтез холестерина в клетках Нер G2 при различных условиях инкубации. Клетки Нер G2, выращенные в 24-ячеечной планшете (содержание клеточного белка 0,2 мг/ячейку), перед экспериментами инкубировали 24 ч в среде, содержащей 10% ЛПДС.

В контрольном эксперименте в каждую лунку вносили по 300 мкл культуральной среды, содержащей 10% ЛПДС и $[1-^{14}\text{C}]\text{AcONa}$ (1 мкКи/мл среды), и проводили инкубацию при 37°C в течение 3 ч.

В первом эксперименте в каждую лунку вносили по 300 мкл 30 мкМ раствора соединений (I) или (II) в культуральной среде с 10% ЛПДС и проводили инкубацию при 37°C в течение 1 ч, после чего вносили $[1-^{14}\text{C}]\text{AcONa}$ (1 мкКи/мл среды) и продолжали инкубацию в тех же условиях еще 3 ч.

Во втором эксперименте в каждую лунку вносили по 300 мкл 30 мкМ раствора соединений (I) или (II) в культуральной среде с 10% ЛПДС и проводили инкубацию при 37°C в течение 24 ч, после чего вносили $[1-^{14}\text{C}]\text{AcONa}$ (1 мкКи/мл среды) и продолжали инкубацию в тех же условиях еще 3 ч.

В третьем эксперименте в каждую лунку вносили по 300 мкл 30 мкМ раствора соединений (I) или (II) в культуральной среде с 10% ЛПДС и проводили инкубацию при 37°C в течение 1 ч, затем среду удаляли, в каждую лунку вносили по 300 мкл культуральной среды с 10% ЛПДС без кетостеринов и инкубировали при 37°C 3 ч, после чего вносили $[1-^{14}\text{C}]\text{AcONa}$ (1 мкКи/мл среды) и продолжали инкубацию в тех же условиях еще 3 ч.

Клетки промывали PBS при 4°C, липиды экстрагировали смесью гексан-изопропанол (3:2), клеточный остаток использовали для определения содержания белка. Экстракты концентрировали в токе азота, липиды анализировали ТСХ в системе гексан : диэтиловый эфир : CH_3COOH (85 : 14 : 1) в присутствии внутренних стандартов (холестерина, холестерилолеата, триолеина, олеиновой кислоты); после проявления фракций в парах иода, зоны соскабливали и проводили измерение радиоактивности в толуольном сцинтилляторе. Уровень биосинтеза выражали как количество $[^{14}\text{C}]$ холестерина, образующееся за 3 ч инкубации с $[1-^{14}\text{C}]$ ацетатом, нормированное на 1 мг клеточного белка (имп/мин/1 мг белка). Контрольное значение (уровень биосинтеза холестерина в отсутствие кетостеринов) составляло 20 400 (имп/мин/1 мг) и было принято за 100%. Все эксперименты проведены в четырех повторах.

Расчёт конформации боковой цепи соединений (I-IV). Структуры конформеров рассчитывали с помощью процедуры стохастического конформационного поиска 'usage directed' [24] в рамках программы молекулярного моделирования HyperChem [25]. Для расчёта энергий использовали параметры силового поля ММ+. В качестве структурных параметров пространства конформационного поиска использовали шесть двугранных углов, образованных атомами углерода боковой цепи. В ходе каждой процедуры поиска проводили не менее 10000 минимизаций полной энергии, и сохраняли не более 2000 конформаций, имеющих энергию в пределах 16 ккал/моль от минимальной. Для структурного анализа конформеров и измерения пространственных параметров боковой цепи использовали программу молекулярной графики VMD [25]. Заселенность локальных энергетических минимумов оценивали исходя из рассчитанных значений полной энергии конформеров в предположении больцмановского распределения при комнатной температуре (293K).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В культуре клеток многие оксистерины подавляют биосинтез холестерина ингибируя активность HMG-CoA редуктазы (фермента, катализирующего скорость-лимитирующую стадию биосинтеза) в основном за счёт ускорения протеосомной деградации фермента, а также снижения экспрессии соответствующего гена путем блокирования процессинга регуляторного белка SREBP-2 [1, 27-30].

Известно, что в клетках Нер G2 15-кетостерин (I) подавляет биосинтез холестерина и активность HMG-CoA редуктазы в микромолярных концентрациях

[1, 16, 31] но достоверно снижает уровень соответствующей мРНК только при концентрации выше 30 мкМ [32]. В клетках СНО К1, напротив, 15-кетостерин (**I**) в микромолярных концентрациях снижает и активность фермента, и уровень мРНК одинаково эффективно [8]. Поскольку производные холестерина подвержены быстрой метаболической деградации в клетках Нер G2, но устойчивы в клетках СНО К1, разумно предположить, что отсутствие эффекта кетостерина (**I**) на уровне мРНК объясняется его быстрой деградацией.

Интересно было выяснить, способны ли более устойчивые к деградации 15-кетопроизводные эргостана (**II–IV**) ингибировать экспрессию гена HMG-CoA редуктазы в клетках Нер G2. Мы провели сравнительное исследование влияния соединений (**I–IV**) на уровень мРНК HMG-CoA редуктазы в клетках Нер G2. Для активации экспрессии HMG-CoA редуктазы клетки Нер G2 предынкубировали 24 ч в безсывороточной среде, затем инкубировали в той же среде еще 24 ч с соединениями (**I–IV**) в концентрации 5 мкМ, после чего проводили измерение уровня мРНК HMG-CoA редуктазы. В этих условиях 15-кетостерин (**I**) не влиял на уровень соответствующей мРНК, однако кетостерины (**II**), (**III**) и (**IV**) проявляли значительный ингибирующий эффект (рис. 2). Эффект зависел от структуры соединений: (22S,23S)-22,23-оксидо-5 α -эргоста-8(14)-ен-15-он-3 β -ол (**III**) был наиболее активен (19% от контроля), а соответствующий (22R,23R)-изомер (**IV**) снижал уровень мРНК HMG-CoA редуктазы значительно слабее (56% от контроля).

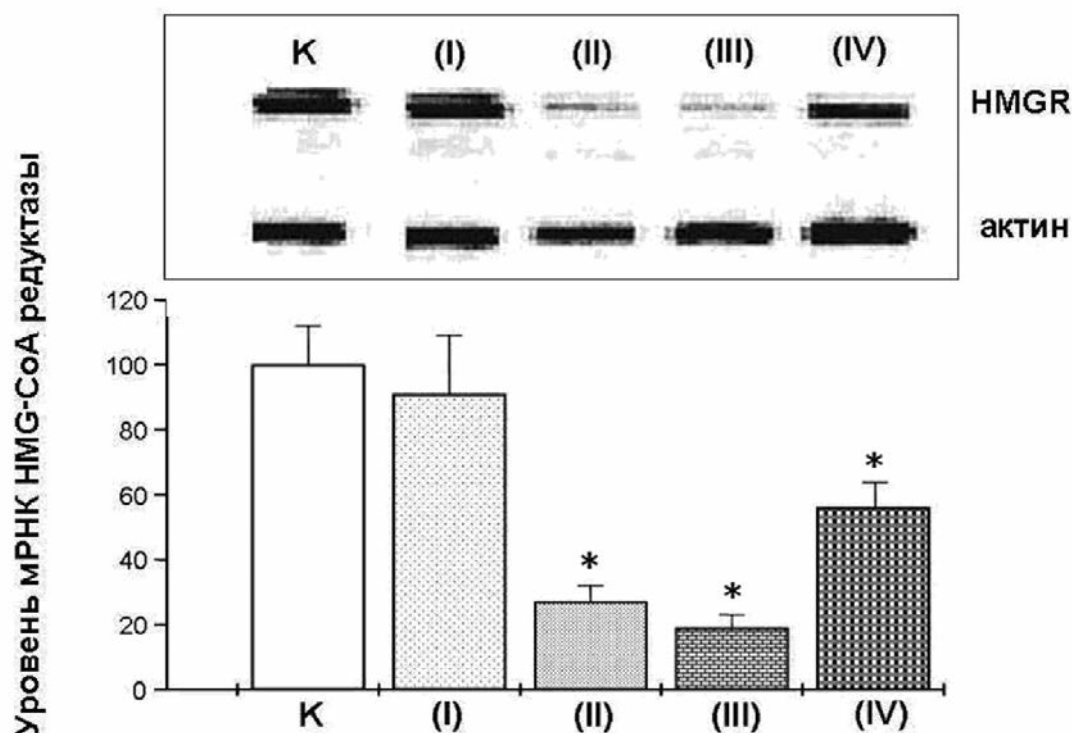


Рисунок 2.

Влияние соединений (**I – IV**) на уровень мРНК HMG-CoA редуктазы в клетках Нер G2. Звёздочкой показана значимость различий в опытных пробах по сравнению с контрольными, $p < 0,001$. Представлены средние величины \pm ошибка средней из 3 независимых экспериментов (на врезке электрофореграмма, условия см. методика).

Ранее нами было показано, что кетостерины (I), (II), (III), (IV) эффективно ингибируют биосинтез холестерина в клетках Нер G2 при краткосрочной инкубации [14, 16]. Поскольку в клетках Нер G2 15-кетостерин (I) подавляет биосинтез холестерина, ингибируя активность HMG CoA редуктазы, но не влияет на уровень соответствующей мРНК, а 15-кетопроизводные эргостана (II), (III), (IV) снижают и активность фермента и уровень соответствующей мРНК, нам показалось интересным сравнить эффекты кетостеринов (I) и (II) на скорость биосинтеза в клетках Нер G2, проводя инкубацию клеток с этими соединениями в разных условиях.

На рисунке 3 показан уровень биосинтеза холестерина в клетках Нер G2: А - после 3 ч инкубации с соединениями (I) и (II) в концентрации 30 мкМ; Б - то же после 24 ч инкубации; В - уровень биосинтеза холестерина в клетках, сначала инкубированных с соединениями (I) и (II), затем выдержанных 3 ч в отсутствие кетостеринов.

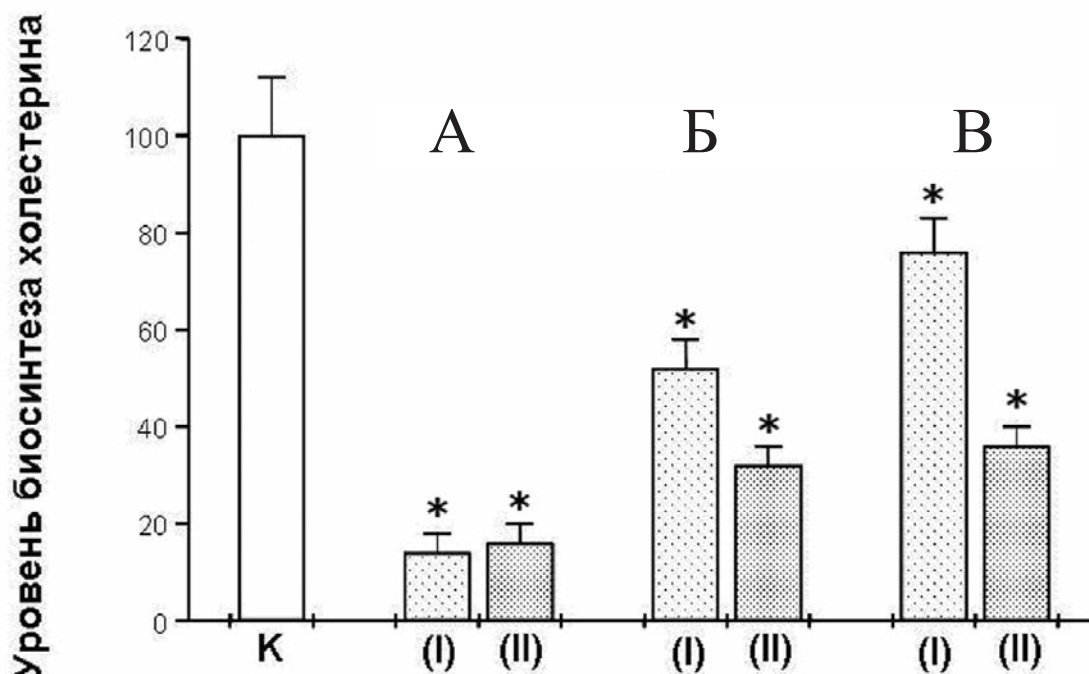


Рисунок 3.

Влияние соединений (I) и (II) на уровень холестерина в клетках Нер G2 из [1-¹⁴C]ацетата в различных условиях:

А - после 3 ч инкубации с указанными соединениями в концентрации 30 мкМ;

Б - после 24 ч инкубации с указанными соединениями в концентрации 30 мкМ;

В - после 3 ч инкубации с указанными соединениями в концентрации 30 мкМ, затем выдержанных 3 ч в среде без стероидов.

Звёздочкой показана значимость различий в опытных пробах по сравнению с контрольными, $p < 0,001$. Представлены средние величины \pm ошибка средней из 4 независимых экспериментов.

15-Кетостерины (I) и (II) в концентрации 30 мкМ одинаково сильно подавляли биосинтез холестерина при краткосрочной инкубации. В условиях 24 ч инкубации, или после дополнительной инкубации в отсутствие кетостерина, ингибирующий эффект кетостерина (I) значительно ослабевал, очевидно, вследствие снижения внутриклеточной концентрации соединения, происходящего из-за его быстрой

метаболической деградации [11]. В этих условиях ингибирующий эффект соединения (II) проявлялся значительно сильнее. Очевидно, 15-кетопроизводное эргостана (II), более устойчивое к метаболической деградации, а также подавляющее биосинтез холестерина на уровне экспрессии гена HMG-CoA редуктазы, является более эффективным ингибитором биосинтеза холестерина в условиях продолжительной инкубации, чем 15-кетопроизводное холестана (I). $\Delta^8(14)$ -15-Кетопроизводные эргостана, содержащие 22,23-эпоксигруппу (III) и (IV), обладают заметной цитотоксичностью [14, 15], поэтому аналогичных экспериментов с соединениями (III) и (IV), требующих их высоких концентраций, мы не проводили.

В работе [17] мы показали, что соединения (III) и (IV) стимулируют образование полярных продуктов из экзогенного холестерина в клетках Hep G2. Предполагая, что эти соединения способны активировать окислительные процессы в клетках печени, мы оценили их влияние, а также влияние соединений (I) и (II) на уровень мРНК CYP27A1 и CYP3A4 – ферментов, играющих важнейшую роль в окислительном метаболизме стероидов и ксенобиотиков, соответственно. Клетки Hep G2 инкубировали с исследуемыми соединениями 24 ч в среде, содержащей 10% FCS. Ни один из исследованных кетостероидов (в концентрации 5 мкМ) не вызывал достоверных изменений в уровне мРНК CYP27A1 (рис. 4), однако кетостероид (IV), значительно (в 3,2 раза) увеличивал уровень мРНК CYP3A4 (рис. 5).

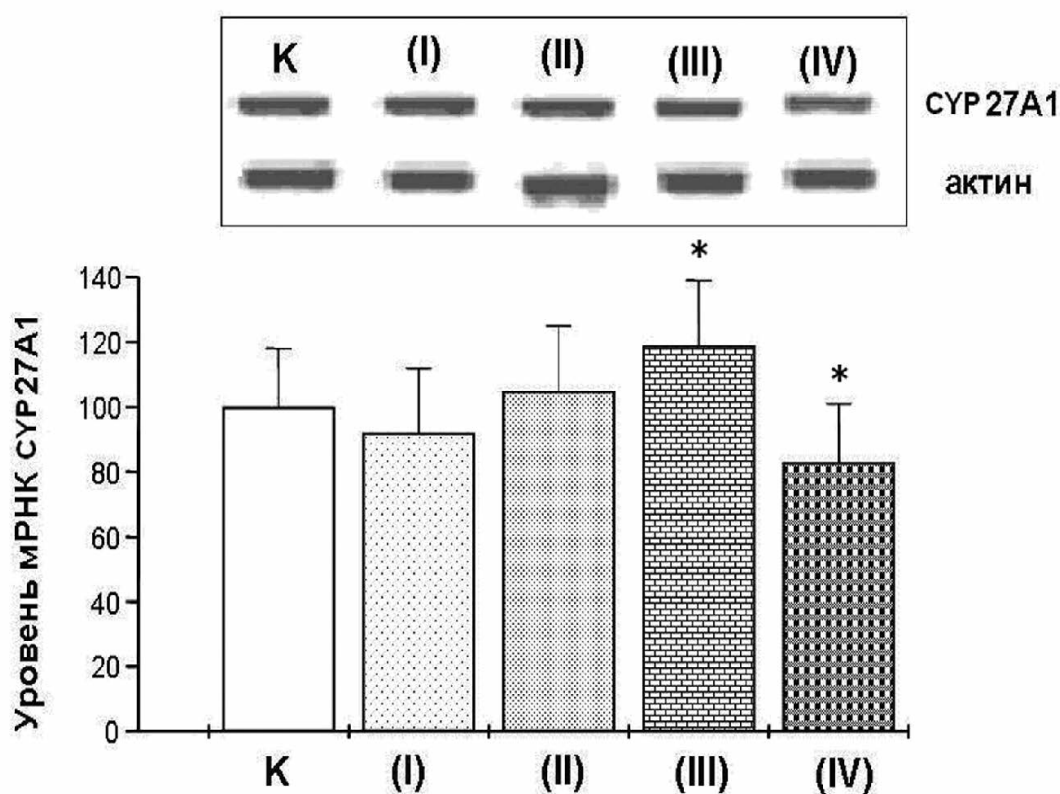


Рисунок 4.

Влияние соединений (I - IV) на уровень мРНК CYP27A1 в клетках Hep G2
Звёздочкой показана значимость различий в опытных пробах по сравнению с контрольными, $p < 0,05$. Представлены средние величины \pm ошибка средней из 3 независимых экспериментов (на врезке электрофореграмма, условия см. методика).

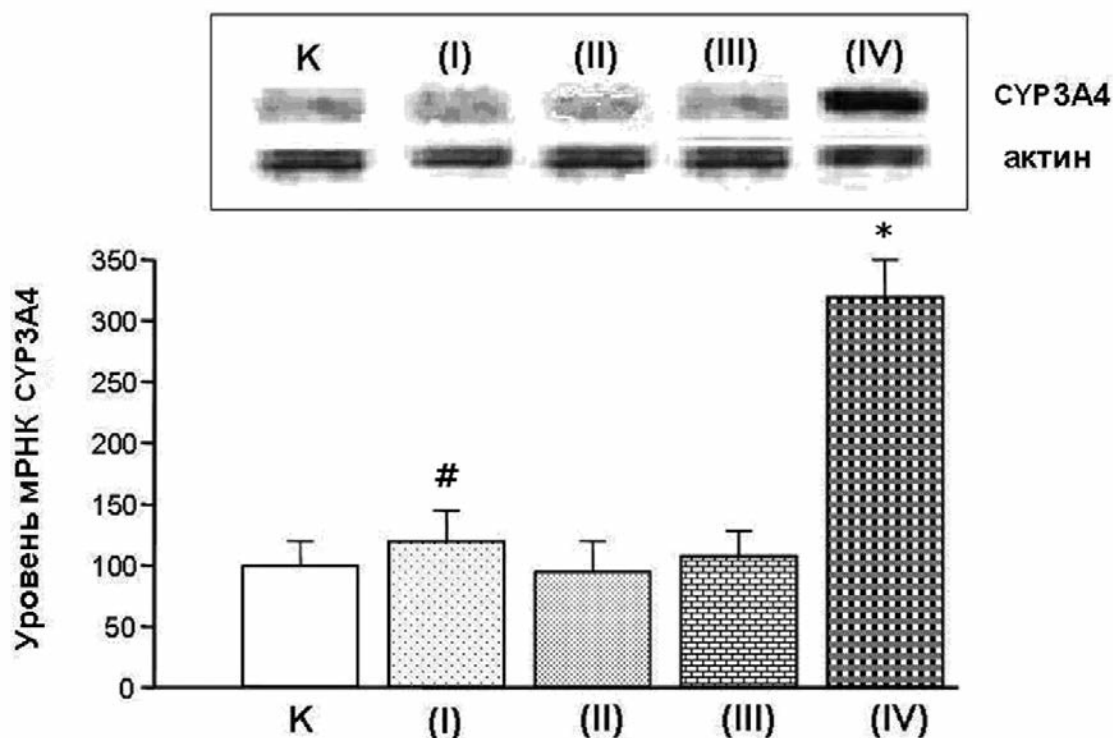


Рисунок 5.

Влияние соединений (I - IV) на уровень мРНК CYP3A4 в клетках Hep G2 Звёздочкой показана значимость различий в опытных пробах по сравнению с контрольными, $p < 0,001$.

Решёткой показана значимость различий в опытных пробах по сравнению с контрольными, $p < 0,05$. Представлены средние величины \pm ошибка средней из 3 независимых экспериментов (на врезке электрофореграмма, условия см. методика).

Наблюдаемые различия в биологической активности кетостероидов (I) – (IV), очевидно, определяются структурными различиями боковой цепи этих соединений. Чтобы выяснить, как структура боковой цепи соединений (I) – (IV) влияет на её конформацию, мы применили метод стохастического конформационного поиска [24-26]; полученные в результате минимизации значения полной энергии были использованы для оценки относительного содержания индивидуальных конформеров. Результаты, представленные на рисунке 6 показывают, что наборы низкоэнергетических конформеров для соединений (I) – (IV) сильно различаются.

Боковая цепь производного холестерина (I) характеризуется высокой конформационной подвижностью. Низкоэнергетические конформеры более жесткой (из-за наличия 22,23-двойной связи) боковой цепи соединения (II) сгруппированы в области трех основных минимумов. Наличие трёх основных минимумов, очевидно, отражает относительную энергию ансамблей конформеров, различающихся двугранными углами C17(C20) и C20(C22). На рисунке 6 можно заметить, что в большинстве низкоэнергетических конформеров C24-изопропильная группа занимает анти-перипланарное положение по отношению к двойной связи. Низкоэнергетические конформеры боковой цепи соединения (III) сгруппированы в области двух основных минимумов; низкоэнергетические конформеры, соответствующие расположению цепи в β -области, отсутствуют. Не менее 85% всех низкоэнергетических конформеров боковой цепи

соединения (IV) расположены в плоскости стероидного цикла так, чтобы обеспечить максимальную удаленность концевых метильных групп (C26-, C27- и C28) от атома C17. Из рисунка 6 следует, что стереохимическая конфигурация атомов C22 и C23 в энантиомерных эпоксидах (III) и (IV) оказывает определяющее влияние на конформацию боковой цепи этих соединений.

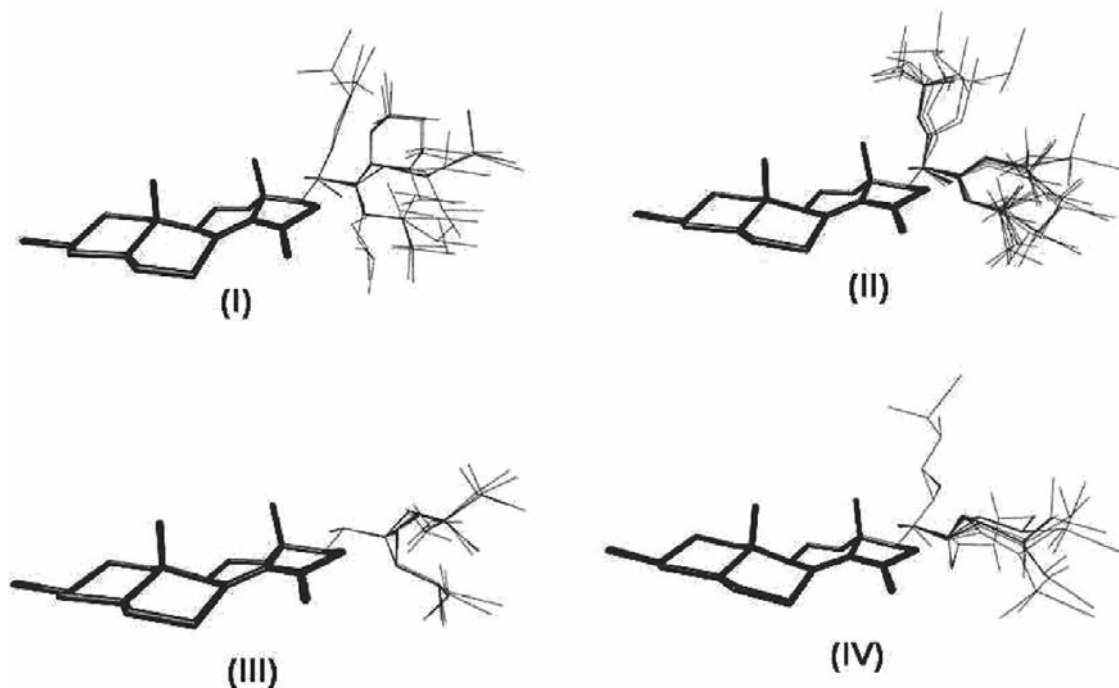


Рисунок 6.

Рассчитанные низкоэнергетические конформации боковой цепи соединений (I-IV).

Таким образом, боковая цепь производных эргостана характеризуется ограниченной подвижностью; введение 22,23-двойной связи или 22,23-эпоксидной группы придаёт боковой цепи дополнительную жёсткость; наборы низкоэнергетических конформеров боковой цепи определяются стереохимической конфигурацией атомов C22 и C23; (22R,23R)-22,23-оксидо-5 α -эргост-8(14)-ен-15-он-3 β -ол (IV), проявляющий высокую токсичность и вызывающий апоптоз [15] обладает наиболее конформационно-жёсткой боковой цепью среди соединений этой серии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Полученные в данной работе результаты позволяют сделать следующие выводы: 1) биологическая активность Δ 8(14)-15-кетостеринов в клетках Нер G2 сильно зависит от структуры и конформации боковой цепи, что привлекает интерес к синтезу и исследованию новых 15-кетостеринов с модифицированной боковой цепью; 2) (22E)-5 α -эргоста-8(14),22-диен-15-он-3 β -ол (II) является эффективным и перспективным регулятором биосинтеза и метаболизма стероидов в клетках печени.

Авторы благодарны к.б.н. Г.Е. Морозевич и к.б.н. Н.И. Козловой за оказанную помощь в работе с клеточными культурами. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (гранты РФФИ №07-04-01155-а и №08-04-90023-Бел_а) и программы "Молекулярная и клеточная биология" Президиума РАН.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Schroepfer G.J. Jr.* (2000) *Physiol. Rev.*, **80**, 361–554.
2. *Schroepfer G.J., Parish E.J., Chen H.W., Kandutsch A.A.* (1977) *J. Biol. Chem.*, **252**, 8975–8980.
3. *Schroepfer G.J., Parish E.J., Kandutsch A.A.* (1980) US Patent, 4.202.891.
4. *Schroepfer G.J., Parish E.J., Kiscic A., Jackson E.M., Farley C.M., Mott G.E.* (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3042–3046.
5. *Schroepfer G.J., Sherril B.C., Wang K.S., Wilson W.K., Kiscic A., Clarkson T.B.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 6861–6865.
6. *Miller L.R., Pajewski T.N., Schroepfer G.J.* (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 2412–2419.
7. *Swaminathan S., Siddiqui A.U., Gerst N., Pinkerton F.D., Kiscic A., Kim L.J., Wilson W.K., Schroepfer G.J.* (1995) *J. Lipid. Res.*, **36**, 767–786.
8. *Schmidt R.J., Ficorilli J.V., Zhang Y., Bramlett K.S., Beyer T.P., Borchert K., Dowless M.S., Houck K.A., Burris T.A., Eacho P.I., Liang G., Guo L., Wilson W.K., Schroepfer G.J., Michael L.F., Cao G.* (2006) *J. Lipid Res.*, **47**, 1037–1044.
9. *Schroepfer G.J., Jr., Kim H.S., Vermilion J.L., Stephens T.W., Pinkerton F.D., Needleman D.H., Wilson W.K., St. Pyrek J.* (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **151**, 130–136.
10. *St. Pyrek J., Vermilion J.L., Stephens T.W., Wilson W.K., Schroepfer G.J.* (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 4536–4543.
11. *Пийр Е.А., Игнатов Д.В., Медведева Н.В., Мишарин А.Ю.* (2003) *Биоорганическая химия*, **29**, 648–654.
12. *Мишарин А.Ю., Тимофеев В.П.* (2004) *Биоорганическая химия*, **30**, 84–88.
13. *Флегентов Г.Ю., Пийр Е.А., Медведева Н.В., Ткачев Я.В., Тимофеев В.П., Мишарин А.Ю.* (2005) *Биоорганическая химия*, **31**, 312–319.
14. *Misharin A.Yu., Ivanov V.S., Mehtiev A.R., Morozovich G.E., Tkachev Ya.V., Timofeev V.P.* (2007) *Steroids*, **72**, 305–312.
15. *Мехтиев А.Р., Тимофеев В.П., Мишарин А.Ю.* (2008) *Биоорганическая химия*, **34**, 755–761.
16. *Пийр Е.А., Медведева Н.В., Каширина Н.М., Шевелев А.Я., Мишарин А.Ю.* (2004) *Биоорганическая химия*, **30**, 547–551.
17. *Мехтиев А.Р., Морозевич Г.Е., Иванов В.С., Мишарин А.Ю.* (2007) *Биомедицинская химия*, **53**, 221–227.
18. *Мехтиев А.Р., Козлова Н.И., Скрипник В.В., Мишарин А.Ю.* (2008) *Биомедицинская химия*, **54**, 250–257.
19. *Pettersson H., Norlin M., Andersson U., Pikuleva I., Björkhem I., Misharin A.Yu., Wikvall K.* (2008) *Biochim. Biophys. Acta*, **1781**, 383–390.
20. *Wilson W.K., Wang K.-S., Kiscic A., Schroepfer G.J.* (1988) *Chem. Phys. Lipids*, **48**, 7–17.
21. *Lindgren F.T.* (1975) in: *Analysis of Lipids and Lipoproteins*, (E.G. Perkins ed.), Am. Oil Chemist's Soc., Amsterdam, pp. 204–224.
22. *Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C.* (1985) *Analyt. Biochem.*, **150**, 76–85.
23. *Chomczynski P., Sacchi N.* (1987) *Analyt. Biochem.*, **162**, 156–159.
24. *Chang G., Guida W.C., Still W.* (1989) *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 4379–4386.
25. HyperChem(TM), Hypercube, Inc., 1115 NW 4th Street, Gainesville, Florida 32601, USA
26. *Humphrey W., Dalke A., Schulten K.* (1996) *J. Molec. Graphics*, **14**, 33–38.
27. *Horton J.D., Goldstein J.L., Brown M.S.* (2002) *J. Clin. Invest.*, **109**, 1125–1131.
28. *Björkhem I., Diczfalussy U.* (2002) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **22**, 734–742.
29. *Adams C.M., Reitz J., De Brabander J.K., Feramisco J.D., Li L., Brown M.S., Goldstein J.L.* (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 52772–52780.

30. Brown M.S., Goldstein J.L. (2009) J. Lipid Res., **50**, S15-27 (doi:10.1194/jlr.R800054-JLR200).
31. Misharin A.Yu., Alquier C., Steinschneider A.Ya., Malugin A.V., Lafont H. (1995) Med. Chem. Res., **5**, 409-416.
32. Киселева А.Ф., Горюнова Л.Е., Медведева Н.В., Алки К., Мишарин А.Ю. (1999) Биохимия, **64**, 456-463.

Поступила: 20. 11. 2010.

**REGULATION OF CHOLESTEROL BIOSYNTHESIS AND METABOLISM
IN Hep G2 CELLS BY $\Delta 8(14)$ -15-KETOERGOSTANE DERIVATIVES**

A.R. Mehtiev¹, V.I. Fedchenko¹, Yu.V. Tkachev², V.P. Timofeev², A.Yu. Misharin¹

¹V.N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 119121 Russia; tel.: (499) 246 5820; e-mail: alexander.misharin@ibmc.msk.ru

²V.A. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia.

The comparative study of effects of 5α -cholest-8(14)-en-15-on-3 β -ol (**I**), (22E)- 5α -ergosta-8(14),22-dien-15-on-3 β -ol (**II**), (22S,23S)-22,23-oxido- 5α -ergost-8(14)-en-15-on-3 β -ol (**III**) and (22R,23R)-22,23-oxido- 5α -ergost-8(14)-en-15-on-3 β -ol (**IV**) on HMG-CoA reductase, CYP27A1 and CYP3A4 genes expression in Hep G2 cells was performed. In the contrast to 15-ketocholestane derivative (**I**), 15-ketoergostane derivatives (**II – IV**) decreased the HMG- CoA reductase mRNA level; (22R,23R)-22,23-oxido- 5α -ergost-8(14)-en-15-on-3 β -ol (**IV**) significantly increased CYP3A4 mRNA level (320% from control). Ketosterol (**II**) was found to be a more potent inhibitor of cholesterol biosynthesis in Hep G2 cells at a prolong incubation, compared with ketosterol (**I**). The side chain conformation of compounds (**I – IV**) was evaluated by computational modeling; the correlation between biological activity of these compounds and conformational flexibility of their side chains was found. The results obtained indicated that $\Delta 8(14)$ -15-ketoergostane derivatives may be used as a sterol biosynthesis and metabolism regulators in liver cells.

Key words: oxysterols, cholesterol, biosynthesis, regulation, Hep G2 cells, side chain conformation.